

## 五、纯化效果检测

- 1、DNA 提取后得到的产物可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测完整性、浓度和纯度。
- 2、DNA 在 260nm 处有吸收峰。OD260 为 1 时大概相当于 50  $\mu$ g/ml 双链 DNA，40  $\mu$ g/ml 单链 DNA。
- 3、核酸浓度 ( $\mu$ g/ml) = OD260  $\times$  50  $\times$  稀释倍数。
- 4、OD260/OD280 的值应该为 1.7~2.0。

## 六、常见问题分析及建议

- 1、DNA 有降解。
  - 1) 血样保存时间过长：尽量使用新鲜血样。
  - 2) 血液取样时没及时处理：取样时应及时处理，尽量 -80 $^{\circ}$ C 保存。
  - 3) 操作过于剧烈：操作时动作幅度不要过大、过于剧烈。
- 2、DNA 产量低。
  - 1) 血样保存时间过长：4 $^{\circ}$ C 保存血样不要超过 3 天，尽量使用新鲜血样。
  - 2) 样品裂解不完全：适当延长裂解时间。
  - 3) 洗脱效率低：洗脱液使用前 37-65 $^{\circ}$ C 预热，自备洗脱液 pH 值不合适，应保证在 7.5-8.5。
- 3、DNA 纯度低。
  - 1) 消化不完全：样品量不要超过规定范围；延长消化时间，使样品充分消化。
  - 2) 洗涤不当：严格按照说明书步骤洗脱。
  - 3) 乙醇未除干净：适当延长晾干时间，使乙醇充分挥发。

# 全血基因组 DNA 快速提取试剂盒

## GV-Whole blood genomic DNA rapid extraction kit

Cat #：GV-BR-DNA-50/GV-BR-DNA-100

产品规格：50T/100T

保存与运输：收到试剂盒，请按照标签要求与相应条件保存。

本试剂盒适用于从加入抗凝剂保存的新鲜血液中提取基因组 DNA，每次可提血液量 100  $\mu$ l-1ml。细胞经裂解和蛋白酶 K 消化后，经特异性结合 DNA 的离心柱吸附和独特的缓冲液系统提取纯化得基因组 DNA。纯化过的基因组 DNA 可以直接用作 PCR 模板、酶切、杂交等分子生物学实验。

### 一、试剂盒组成、储存、稳定性

成分	50T	100T	注意事项
Proteinase K	1ml	2ml	-20 $^{\circ}$ C
Buffer CL	60ml	120ml	
Buffer GB	13ml	26ml	
Buffer GR	13ml	26ml	
Buffer BL	13ml	26ml	
Buffer WH1	18ml	36ml	Add 42ml(50T)/84ml(100T)ethanol
Buffer WH2	16ml	16ml $\times$ 2	Add 64 ml ethanol
Elution Buffer	10ml	20ml	For DNA Elute
Spin Columns	50	100	Max adsorption up to 20 $\mu$ g each
1.5ml Tubes	50	100	
Handbook	1	1	

Proteinase K: -20℃保存。

Buffer CL: 细胞裂解液。

Buffer GB: 若提取全血起始量小于 200 μl, 则使用 Buffer GB 补全至 200 μl。

Buffer GR: 裂解液, 室温低时可能有沉淀, 37-65℃水浴溶解。

Buffer BL: 平衡液, 平衡液的加入能够激活硅基质膜, 改善吸附柱的吸附能力并提高吸附柱的均一性和稳定性, 专一吸附 DNA 的作用, 同时还可消除高温、潮湿或其他不良环境因素对吸附柱造成的影响。

Buffer WH1: 去蛋白液, 室温密闭贮存。

Buffer WH2: 去盐液, 室温密闭贮存。

Elution Buffer: 10mM Tris-HCl, pH8.0。室温密闭贮存。

## 二、 注意事项

- 1、DNA 呈酸性, 建议在 10mM Tris-HCl, pH8.0 洗脱液中保存。
- 2、用平衡液处理过的柱子最好当天使用, 放置时间过长会影响效果。
- 3、抗凝剂不能采用肝素, 因为肝素是聚合酶链式反应的抑制剂。
- 4、Buffer CL、Buffer GR 和 Buffer BL 含有刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套和眼镜, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服, 谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时, 要立即用大量清水或生理盐水冲洗, 必要时寻求医疗咨询。

## 三、 实验前试剂准备

- 1、使用前 Buffer WH1 和 Buffer WH2 中按照试剂瓶上指定量加入无水乙醇。
- 2、检查 Buffer GR 是否出现沉淀, 若有沉淀, 应于 37-65℃温浴溶解后再使用。
- 3、将 Elution Buffer 37-65℃预热, 有利于提高洗脱效率。

## 四、 操作步骤

- 1、离心柱预处理: 在离心柱中加入 200ul Buffer BL, 12000rpm 离心 1min, 去掉收集管中的平衡液。
- 2、血液处理:
  - a、提取 200 μl 血液样品时, 可直接进行下一步实验。

- b、提取小于 200 μl 血液样品时, 可加 Buffer GB 补足体积至 200 μl, 再进行下一步实验。

注: 步骤 a 和 b 适用于大多数 100-200 μl 血液样品的提取, 但有些血液样品由于蛋白, 糖类, 脂类含量较多或样本储存条件不佳会导致 OD260/OD230 比值偏低, 如需提高 OD260/OD230 比值可在样品中加入 1-2.5 倍血液样品体积的细胞裂解液 CL 进行处理, 具体步骤同 c。

- c、提取大于 200 μl 血液样品时, 需 Buffer CL 处理, 具体步骤如下: 在样品中加入 1-2.5 倍血液样品体积的 Buffer CL, 颠倒混匀, 12,000rpm 离心 1min, 上清, 留下细胞核沉淀 (如果裂解不彻底, 可加入 1-2.5 倍血液样品体积的 Buffer CL 重复裂解一次), 向细胞核沉淀中加 200 μl 缓冲液 GB, 振荡至彻底混匀, 再进行下一步实验。

注: 如果需要去除 RNA, 可加入 20 μl RNase A(10mg/ml) 溶液 (NEP027)(需自备) 至上述处理获得的 200 μl 样品中, 振荡 15s, 室温放置 5min。

- 3、加入 200 μl 的 Buffer GR, 20 μl Proteinase K, 振荡混匀。70℃水浴 10 min。若血液较多可延长裂解时间至溶液清亮, 期间温和混匀几次。

注: 裂解后溶液偏黑绿色。

- 4、恢复至室温后, 加入 100 μl 异丙醇, 充分混匀。

- 5、将混匀的液体转入离心柱中 (离心柱需用平衡液处理), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液。

- 6、加入 700 μl Buffer WH1, 12,000 rpm 离心 1min, 弃废液。

- 7、加入 700 μl Buffer WH2, 12,000 rpm 离心 1min, 弃废液。

- 8、加入 500 μl Buffer WH2, 12,000 rpm 离心 1min, 弃废液。

- 9、再次 12,000 rpm 离心 2min, 将离心柱置于新的离心管中, 并打开离心柱盖, 于室温或 37℃恒温箱放置 5~10 min 直至无明显乙醇味。

- 10、在离心柱中央加入 50-200 μl Elution buffer(37-65℃预热), 室温放置 2~5min, 12,000rpm 离心 2min。

- 11、离心得到的溶液再次加入离心柱中, 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 2 min。所得的溶液为纯化后的 DNA。